

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|--|--|--|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 16/18, G01N 33/68 | | A2 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/18131 |
| | | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1999 (15.04.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02942 | | (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1998 (30.09.98) | | | |
| (30) Prioritätsdaten: 197 44 132.7 1. Oktober 1997 (01.10.97) DE | | Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> | |
| (71)(72) Anmelder und Erfinder: BLÄSS, Stefan [DE/DE]; Furkastrasse 74, D-12107 Berlin (DE). | | | |
| (72) Erfinder; und | | | |
| (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BURMESTER, Gerd-R. [DE/DE]; Tullerweg 7, D-12277 Berlin (DE). | | | |
| (74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, D-10315 Berlin (DE). | | | |
| (54) Title: ANTI-BiP-ANTIBODIES IN RHEUMATOID ARTHRITIS, METHOD AND TEST KITS FOR DETECTING THEM | | | |
| (54) Bezeichnung: ANTI-BIP-ANTIKÖRPER BEI RHEUMATOIDER ARTHRITIS SOWIE VERFAHREN UND TESTKITS ZU IHRER BESTIMMUNG | | | |
| (57) Abstract | | | |
| <p>The invention relates to anti-heavy chain binding protein antibodies (anti-BiP-antibodies) in the body fluids of patients with rheumatoid arthritis, and a method for their detection. The invention relates in particular to a method for detecting these antibodies <i>in vitro</i> as auto-antibodies for serological diagnosis of rheumatoid arthritis during differential diagnosis in relation to other rheumatic diseases.</p> | | | |
| (57) Zusammenfassung | | | |
| <p>Die Erfindung betrifft Anti-Heavy Chain Binding Protein-Antikörper (Anti-BiP-Antikörper) in Körperflüssigkeiten von Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie den Nachweis von Anti-BiP-Antikörpern. Sie bezieht sich insbesondere auf den Nachweis dieser Antikörper als Autoantikörper für die serologische Diagnostik einer rheumatoiden Arthritis in Differentialdiagnose zu anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises <i>in vitro</i>.</p> | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshon | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | | | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | ML | Mali | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MN | Mongolei | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MR | Mauritanien | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MW | Malawi | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | MX | Mexiko | | |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CM | Kamerun | | | PL | Polen | | |
| CN | China | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CU | Kuba | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CZ | Tschechische Republik | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| DE | Deutschland | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DK | Dänemark | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| EE | Estland | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

ANTI-BIP-ANTIKÖRPER BEI RHEUMATOIDER ARTHRITIS SOWIE VERFAHREN UND TESTKITS ZU IHRER BESTIMMUNG

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft Anti-Heavy Chain Binding Protein-Antikörper (Anti-BiP-Antikörper) sowie Verfahren und Testkits zur Bestimmung von Anti-Heavy Chain Binding Protein (Anti-Grp78)-Antikörpern in Körperflüssigkeiten. Sie bezieht sich insbesondere auf den Nachweis dieser Antikörper als Autoantikörper für die serologische Diagnostik einer rheumatoiden Arthritis in Differentialdiagnose zu anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises *in vitro*.

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung, von der ca. 1-2% der Bevölkerung betroffen sind. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Bildung von Autoantikörpern, vor allem Rheumafaktoren. Rheumafaktoren sind bislang die einzigen serologische Marker, die zur Diagnostik der RA eingesetzt werden. Sie sind jedoch auch in anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, wie dem systemischen Lupus erythematodes, der systemischen Sklerodermie und den Mischkollagenosen und sogar in der gesunden Bevölkerung nachweisbar. Die Spezifität des Rheumafaktors für die RA beträgt nur 74%, seine Häufigkeit unter RA-Patienten 68% (Bläß St, Specker Ch, Lakomek HJ, Schneider EM, Schwochau M. Novel 68k autoantigen detected by rheumatoid arthritis (RA) specific autoantibodies. Ann Rheum Dis 1995;54:355-60). Die RA ist eine sehr heterogene und daher schwer zu diagnostizierende Erkrankung. Zur Diagnosestellung der RA existieren sieben Kriterien des American College for Rheumatism, von denen mindestens vier erfüllt sein müssen (Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA jr, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988;31:315-24). Darunter befindet sich nur ein einziger serologischer Marker, der Rheumafaktor. Daher ist eine Verbesserung der Diagnosestellung durch weitere und ggf. spezifischere serologische Parameter insbesondere auch für eine adäquate und zeitgemäße Behandlung von größter Bedeutung.

Heavy Chain Binding Protein (BiP), ursprünglich beschrieben als Glucose Regulated Protein 78, ist ein sogenanntes molekulares Chaperon, das im endoplasmatischen Retikulum vorkommt und für die Faltung und Komplexierung von Proteinen verantwortlich ist, die den sekretorischen Weg beschreiten. Es gehört zur Hsp70-Familie der Streßproteine und ist ein ubiquitär exprimiertes, hochkonserviertes und in Hefe essentielles Protein. BiP wurde

bislang nicht in Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis gebracht. Dies mag seine Ursache darin haben, daß die Anti-BiP-Antikörper gegen ein glykosidisches Epitop gerichtet sind, das in den bislang eingesetzten Expressionssystemen nicht exprimiert wird.

Der Erfindung liegen die Aufgaben zugrunde, Anti-Heavy Chain Binding Protein-Antikörper von Patienten mit rheumatoider Arthritis zur Verfügung zu stellen, ein sicheres Verfahren zur Bestimmung von Anti-BiP-Autoantikörpern bereitzustellen sowie entsprechende Testverfahren zu entwickeln.

Die Aufgaben wurden dadurch gelöst, daß Anti-BiP-Antikörper gewonnen wurden, indem natürliches (biochemisch gereinigtes) oder rekombinantes BiP an eine feste Phase gebunden und zur Anreicherung der Antikörper aus Körperflüssigkeiten verwendet wurde. Die Ablösung der Antikörper aus dem Antigen-Antikörper-Komplex erfolgt mit Hilfe chaotroper Substanzen.

Erfindungsgemäß wird BiP natürlich (biochemisch gereinigt) oder rekombinant an feste Phasen adsorptiv oder kovalent oder durch Elektrotransfer gebunden und zum Nachweis der Anti-BiP-Antikörper in verschiedenen Immunoassays eingesetzt. Besonders bevorzugt ist das Antigen in seiner glykosylierten Form.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung von Anti-BiP-Antikörpern in Körperflüssigkeiten besteht darin, das Protein BiP an feste Phasen zu binden und im Immunoassay einzusetzen. Dabei wird BiP adsorptiv oder kovalent an feste Phasen gebunden, gegebenenfalls nach vorheriger chemischer Aktivierung der festen Phase. Als Antigen wird natürliches (biochemisch gereinigtes) oder rekombinantes BiP eingesetzt. Die feste Phase besteht aus Polystyren, Polyvinylidenfluorid oder Nitrocellulose in unterschiedlichen geometrischen Formen, wie Mikrotitrationsplatten, Röhrchen oder in kugelförmiger bzw. flächenförmiger Gestalt.

Die Anti-BiP-Antikörper werden gebunden im Immunoassay bestimmt. Dabei erfolgt die Bindung der Anti-BiP-Antikörper in geeigneten Puffern, die nicht-ionische oder ionische Detergenzien oder Proteine enthalten. Die gebundenen Anti-BiP-Antikörper werden durch spezifische Konjugate, die gegen einzelne Immunglobulinklassen oder gegen mehrere gerichtet sind, nachgewiesen.

Der erfindungsgemäße Testkit zur Bestimmung von Anti-BiP-Antikörpern ist gekennzeichnet durch:

- BiP in gereinigter oder rekombinanter Form, das adsorptiv oder kovalent an eine feste Phase gebunden ist,
- einen Puffer zur Verdünnung der zu untersuchenden biologischen Flüssigkeit, der nicht-ionische oder ionische Detergenzien oder Proteine enthält,
- ein spezifisches Konjugat, bestehend aus einem Antikörper, der gegen humanes Immunglobulin IgG, IgM, IgA oder mehrere dieser Immunglobuline gerichtet ist und ein Enzym bzw. einen Fluoreszenzfarbstoff oder eine radioaktiv markierte Komponente,

- einen Puffer zum Verdünnen des Konjugates, der nicht-ionische oder ionische Detergenzien oder Proteine enthält,
- einen Puffer zum Waschen (Entfernen) der nichtgebundenen Immunreaktanten, der nicht-ionische oder ionische Detergenzien oder Proteine enthält,
- eine Substratlösung zum Nachweis der Enzymreaktion und
- eine Stopplösung zum Unterbrechen der Enzymreaktion.

Durch die hohe Prävalenz der erfindungsgemäßen Anti-BiP-Antikörper liegt überraschenderweise ein neuer wichtiger diagnostischer Marker vor. Da BiP innerhalb der Zelle eine essentielle Funktion hat, kann ein Zusammenhang zwischen Antikörperbildung und Pathogenese hergestellt werden. Die erfindungsgemäßen Antikörper stellen einen wichtigen Befund zur Differentialdiagnose gegenüber anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises dar, bei denen diese Antikörper nicht auftreten.

Zum Nachweis der Antikörper gegen BiP werden in der Immunologie etablierte Verfahren wie Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Sandwich-ELISA und Immunoblot eingesetzt. Die Analyse der Antikörperreaktivitäten im ELISA hat im Vergleich zu der Methode des Immunoblots vor allem den Vorteil des geringeren Zeitaufwandes und der niedrigen Kosten. Deshalb wird der ELISA als Screening-Methode eingesetzt. Wird eine Feinanalyse der Antikörperreaktivität angestrebt, so kommt der Immunoblot zum Einsatz.

Auf der Basis des Nachweises eines serologischen Markers (Anti-BiP-Antikörper) bei Patienten mit rheumatoider Arthritis konnten erfindungsgemäß Autoantikörper gegen BiP bei Patienten mit rheumatoider Arthritis in 66% der Fälle im ELISA und im Immunoblot nachgewiesen werden. Dabei wurden Patientenseren hinsichtlich einer Autoreaktivität gegen gereinigtes (natürliches) BiP getestet.

Erfindungsgemäß wurde angezeigt, daß die Anti-BiP-Antikörper bei RA-Patienten mit großer Häufigkeit auftreten. Diese Antikörper richten sich vorwiegend gegen ein glykosidisches Epitop, dessen Hauptdeterminante N-Acetylglucosamin ist. BiP wurde aufgrund seiner molekularen und biochemischen Eigenschaften (relative molekulare Masse, isoelektrischer Punkt, Aminosäuresequenz) charakterisiert.

Anschließend wird die Erfindung an Beispielen näher erläutert, die die Erfindung aber nicht auf diese beschränken sollen.

Ausführungsbeispiele

In die Untersuchungen gingen 214 Patienten mit RA, 47 Patienten mit systemischem Lupus erythematoses, 23 Patienten mit Psoriasis-Arthritis, 24 Patienten mit systemischer Sklerose,

6 Patienten mit Mischkollagenose, 13 Patienten mit Osteoarthrose, 13 mit ankylosierender Spondylitis, 4 mit reaktiver Arthritis, 10 mit Morphea, sowie 100 gesunde Spender ein. Die Reinigung des BiP erfolgte aus HeLa-Zellen, wobei die Reinigungsschritte standardisiert sind.

5 Beispiel 1

Gewinnung von Anti-BiP-Antikörpern aus Körperflüssigkeiten von Patienten mit RA

Kopplung von BiP an feste Phase

Blockierung überzähliger Bindungsstellen

10 Inkubation mit Körperflüssigkeiten von Patienten mit RA

Waschen (Entfernen) nicht-gebundener Immunreaktanten

Ablösen spezifisch gebundener Anti-BiP-Antikörper durch Behandlung mit chaotropen

Salzen, z.B. 3 M Guanidiniumisothiocyanat-Lösung

Waschen und Konzentrierung der Antikörper

15 Beispiel 2

Herstellung des ELISA zum Nachweis von Anti-BiP-Antikörpern

Beschichtung des BiP an die feste Phase des ELISA

20 Für die Beschichtung wurden 96-Well Polystyren-Platten verwendet. Die Beschichtung erfolgte mit 10-15ng BiP pro Well. Als Benetzungsmedium diente 50mM Carbonatpuffer, pH 9.5. Die Benetzung erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Platten entweder weiter verwendet oder bei -20°C eingefroren.

Vor dem Auftrag der Proben erfolgte eine Vorblockierung der Platten mit je 100µl

25 Probenpuffer [Phosphate Buffered Saline mit Nonidet P40, (PBS-NP40), 0.1%, pH 7.0], anschließend der Probenauftrag (Serumverdünnung 1:20 in Probenpuffer) mit je 50µl/well über 3 Stunden bei Raumtemperatur (Probenauftragung von Patientenserum und von Kontrollserum gesunder Spender und Patienten des rheumatischen Formenkreises). Als Eichkurve wurde ein stark positives Patientenserum (Standardserum) in 6 linearen
30 Verdünnungsschritten, beginnend bei 1:10 mitgeführt. Anschließend erfolgte dreimal der Waschvorgang mit Waschpuffer.

Konjugatzugabe

Die Inkubation mit Alkalische Phosphatase(AP)-markiertem Anti-Human-IgG erfolgte in einer Verdünnung von 1:3000 in Probenpuffer mit jeweils 50µl/well über 3 Stunden bei

35 Raumtemperatur. Anschließend wurde dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen.

Substratreaktion:

Die Färbung der Antigen-Antikörperreaktion erfolgte mit BCIP / NBT (5-Bromo-3-chloro-indolylphosphat / Nitro-Blue Tetrazolium) in alkalischem Puffer.

Die gemessene Antikörperreaktivität des Standardserums in der Verdünnungsstufe 1:20 wurde mit 10000 Relativen Einheiten (RE) definiert. Die Verdünnungsstufen 1:10, 1:30, 1:50, 1:100, 1:500 entsprechen demnach 20000RE, 6667RE, 4000RE, 1000RE, 200RE. Die Messung der Eichkurve und der Serenproben erfolgte als Dreifachbestimmung. War die Antikörperreaktivität in einem Serum höher als im Standardserum, so wurde es in höheren Verdünnungsstufen erneut gemessen. Die resultierenden RE wurden dann mit dem gegenüber 1:100 höheren Verdünnungsfaktor multipliziert.

Im ELISA konnten Anti-BiP-Antikörper bei 66% der RA-Patienten und bei 0.5% der Patienten mit anderen Diagnosen des rheumatischen Formenkreises, nicht aber bei gesunden Spendern nachgewiesen werden.

Beispiel 3

HeLa-Zellen wurden in einem Puffer lysiert, der Gardol, Harnstoff und 2-Mercaptoethanol enthielt und bei 70°C für 15 min inkubiert. Die lysierten Zellen wurden mit einer gesättigten Cäsiumchloridlösung bei Raumtemperatur auf eine Dichte von $\rho = 1.6 \text{ g/cm}^3$ gebracht und für 2 Stunden bei 10,000g ultrazentrifugiert. Das resultierende Proteinfloater wurde in einem Lyspuffer aufgenommen, der anstelle des Gardol das nicht-ionische Detergenz NP40 enthielt und gegen 25mM Tris-Puffer dialysiert. Das Material wurde mit Ethanol gefällt und auf einer Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamide Gelelectrophoresis (SDS-PAGE) mit einem 10-20%igen Acrylamidgradienten nach molekularer Masse aufgetrennt. Gele wurden auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) elektrotransferiert.

Elektrotransfers wurden mit PBS-NP40 und BSA blockiert und in Streifen geschnitten. Jeder Streifen wurde mit einem in PBS-NP40 1:20-verdünnten Serum über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Streifen in einem Waschpuffer (PBS-NP40) gewaschen und mit AP-konjugiertem Zweitantikörper inkubiert. Dessen Verdünnung betrug 1:5,000 in PBS-NP40, seine Inkubationszeit 1 Stunde. Nach erneutem Waschen in PBS-NP40 wurde in AP-Puffer (pH 8.7) inkubiert und Substrat für die Farbreaktion (BCIP/NBT) zugegeben. Bei ausreichender Färbung der Immunreaktionen wurde mit neutralem oder saurem Puffer gestoppt.

Patentansprüche

1. Neue Anti-Heavy Chain Binding Protein-Antikörper (Anti-BiP-Antikörper) aus Homo sapiens sapiens, erhalten durch Immunadsorption an natürliches (biochemisch gereinigtes) oder rekombinantes BiP aus Homo sapiens sapiens und Ablösen der Antikörper durch Behandlung mit chaotropen Salzen.
2. Verfahren zur Bestimmung von Anti-BiP-Antikörpern nach Anspruch 1 in Körperflüssigkeiten, gekennzeichnet dadurch, daß BiP an feste Phasen gebunden und im Immunoassay eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung des BiP-Antigens adsorptiv oder kovalent an feste Phasen erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, gekennzeichnet dadurch, daß die Bindung des BiP-Antigens adsorptiv oder kovalent nach vorheriger chemischer Aktivierung an feste Phasen erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 2 bis 4, gekennzeichnet dadurch, daß als Antigen natürliches, biochemisch gereinigtes oder rekombinantes BiP eingesetzt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 2 bis 5, gekennzeichnet dadurch, daß die Bindung des BiP über spezifische monoklonale Anti-BiP-Antikörper erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 2 bis 6, gekennzeichnet dadurch, daß die feste Phase aus Polystyren, Polyvinylidenfluorid oder Nitrocellulose besteht.
8. Verfahren nach Anspruch 2 bis 7, gekennzeichnet dadurch, daß die feste Phase eine unterschiedliche geometrische Form hat.
9. Verfahren nach Anspruch 2 bis 8, gekennzeichnet dadurch, daß die als feste Phase dienenden Träger in Form einer Mikrotitrationsplatte oder eines Röhrchens vorliegen oder eine kugelförmige oder flächenförmige Gestalt haben.
10. Verfahren nach Anspruch 2 bis 9, gekennzeichnet dadurch, daß die Anti-BiP-Antikörper gebunden im Immunoassay bestimmt werden.

11. Verfahren nach Anspruch 2 bis 10, gekennzeichnet dadurch, daß die Bindung der Anti-BiP-Antikörper in Puffern, die nicht-ionische oder ionische Detergenzien oder Proteine enthalten, erfolgt.

12. Verfahren nach Anspruch 2 bis 11, gekennzeichnet dadurch, daß die gebundenen Anti-BiP-Antikörper durch spezifische Konjugate, die gegen einzelne Immunglobulinklassen oder gegen mehrere gerichtet sind, nachgewiesen werden.

13. Verfahren nach Anspruch 2 bis 12, gekennzeichnet dadurch, daß die spezifischen Konjugate aus Antikörpern, die gegen humanes Immunglobulin G, M oder A oder mehrere dieser Immunglobuline gerichtet sind und einem Enzym oder einem Fluoreszenzfarbstoff oder einer radioaktiv markierten Komponente bestehen.

14. Testkit zur Bestimmung von Anti-BiP-Antikörpern nach Anspruch 1, bestehend aus

- BiP, das an eine feste Phase gebunden ist,
- einem Puffer zur Verdünnung der zu untersuchenden biologischen Flüssigkeit
- einem spezifischen Konjugat
- einem Puffer zum Verdünnen des Konjugates
- einem Puffer zum Waschen der nichtgebundenen Immunreaktanten
- einer Substratlösung und
- einer Stopplösung.

15. Testkit nach Anspruch 14, gekennzeichnet durch

- BiP, das adsorptiv oder kovalent an eine feste Phase gebunden ist,
- einen Puffer zur Verdünnung der zu untersuchenden biologischen Flüssigkeit, der nicht-ionische oder ionische Detergenzien oder Proteine enthält,
- ein spezifisches Konjugat, bestehend aus einem Antikörper, der gegen humanes Immunglobulin IgG, IgM, IgA oder mehrere dieser Immunglobuline gerichtet ist, und einem Enzym oder einem Fluoreszenzfarbstoff oder einer radioaktiv markierten Komponente,
- einen Puffer zum Verdünnen des Konjugates, der nicht-ionische oder ionische Detergenzien oder Proteine enthält,
- einen Puffer zum Waschen (Entfernen) der nichtgebundenen Immunreaktanten, der nicht-ionische oder ionische Detergenzien oder Proteine enthält,
- eine Substratlösung zum Nachweis der Enzymreaktion und
- eine Stopplösung zum Unterbrechen der Enzymreaktion.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|-----------|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 16/18, G01N 33/68 | A3 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/18131 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1999 (15.04.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02942 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1998 (30.09.98) (30) Prioritätsdaten: 197 44 132.7 1. Oktober 1997 (01.10.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BLÄSS, Stefan [DE/DE]; Furkastrasse 74, D-12107 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BURMESTER, Gerd-R. [DE/DE]; Tullerweg 7, D-12277 Berlin (DE). (74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, D-10315 Berlin (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 17. Juni 1999 (17.06.99) |
| (54) Title: ANTI-BiP-ANTIBODIES IN RHEUMATOID ARTHRITIS, METHOD AND TEST KITS FOR DETECTING THEM (54) Bezeichnung: ANTI-BIP-ANTIKÖRPER BEI RHEUMATOIDER ARTHRITIS SOWIE VERFAHREN UND TESTKITS ZU IHRER BESTIMMUNG (57) Abstract <p>The invention relates to anti-heavy chain binding protein antibodies (anti-BiP-antibodies) in the body fluids of patients with rheumatoid arthritis, and a method for their detection. The invention relates in particular to a method for detecting these antibodies <i>in vitro</i> as auto-antibodies for serological diagnosis of rheumatoid arthritis during differential diagnosis in relation to other rheumatic diseases.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft Anti-Heavy Chain Binding Protein-Antikörper (Anti-BiP-Antikörper) in Körperflüssigkeiten von Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie den Nachweis von Anti-BiP-Antikörpern. Sie bezieht sich insbesondere auf den Nachweis dieser Antikörper als Autoantikörper für die serologische Diagnostik einer rheumatoiden Arthritis in Differentialdiagnose zu anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises <i>in vitro</i>.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/02942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C07K16/18 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| X | <p>CRIBB A E ET AL.: "Patients with delayed-onset sulfonamide hypersensitivity reactions have antibodies recognizing endoplasmic reticulum luminal proteins" J. PHARMACOL. EXP. THERAP., vol. 282, no. 2, August 1997, pages 1064-1071, XP002097729 see page 1066, left-hand column, line 10 see page 1066, right-hand column, line 14-28 see page 1068, left-hand column, line 8 - right-hand column, line 20 see page 1070, right-hand column, line 32-40</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p> | 1-15 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 March 1999

Date of mailing of the international search report

09/04/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Covone, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/02942

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| Y | <p>CONROY S E ET AL.: "Incidence of anti hsp 90 and 70 antibodies in children with SLE, juvenile dermatomyositis and juvenile chronic arthritis"</p> <p>CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY, vol. 14, no. 1, January 1996, pages 99-104, XP002097731</p> <p>see page 101, left-hand column, line 17-31</p> <p>- right-hand column, line 40-53</p> <p>see page 103, left-hand column, line 32-40</p> <p>---</p> | 1-15 |
| Y | <p>JINDAL S: "Heat shock proteins: applications in health and disease"</p> <p>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 14, no. 1, January 1996, page 17-20</p> <p>XP004035805</p> <p>see table 1</p> <p>---</p> | 1-15 |
| A | <p>TISHLER M ET AL: "Anti- heat - shock protein antibodies in rheumatic and autoimmune diseases."</p> <p>SEMINARS IN ARTHRITIS AND RHEUMATISM, (1996 OCT) 26 (2) 558-63. REF: 25 JOURNAL CODE: UMW. ISSN: 0049-0172., XP002097730</p> <p>United States</p> <p>see abstract</p> <p>see page 558, right-hand column, line 3-19</p> <p>see page 560, right-hand column, line 7-22</p> <p>see page 561, right-hand column, line 39 -</p> <p>page 562, right-hand column, line 26</p> <p>---</p> | 1-15 |
| A | <p>MACARIO A J: "Heat - shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics."</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY RESEARCH, (1995) 25 (2) 59-70. REF: 91 JOURNAL CODE: A81. ISSN: 0940-5437., XP002097732</p> <p>GERMANY: Germany, Federal Republic of</p> <p>see page 61; table 2</p> <p>see page 62, right-hand column, line 24-30</p> <p>see page 68, left-hand column, line 17-39</p> <p>-----</p> | 1-15 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02942

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K16/18 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie ¹ | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------------------|---|--------------------|
| X | <p>CRIBB A E ET AL.: "Patients with delayed-onset sulfonamide hypersensitivity reactions have antibodies recognizing endoplasmic reticulum luminal proteins" J. PHARMACOL. EXP. THERAP., Bd. 282, Nr. 2, August 1997, Seiten 1064-1071, XP002097729 siehe Seite 1066, linke Spalte, Zeile 10 siehe Seite 1066, rechte Spalte, Zeile 14-28 siehe Seite 1068, linke Spalte, Zeile 8 - rechte Spalte, Zeile 20 siehe Seite 1070, rechte Spalte, Zeile 32-40</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p> | 1-15 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

¹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. März 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/04/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Covone, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02942

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie: | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| Y | <p>CONROY S E ET AL.: "Incidence of anti hsp 90 and 70 antibodies in children with SLE, juvenile dermatomyositis and juvenile chronic arthritis"</p> <p>CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY, Bd. 14, Nr. 1, Januar 1996, Seiten 99-104, XP002097731</p> <p>siehe Seite 101, linke Spalte, Zeile 17-31 - rechte Spalte, Zeile 40-53 siehe Seite 103, linke Spalte, Zeile 32-40</p> <p>---</p> | 1-15 |
| Y | <p>JINDAL S: "Heat shock proteins: applications in health and disease"</p> <p>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 14, Nr. 1, Januar 1996, Seite 17-20</p> <p>XP004035805</p> <p>siehe Tabelle 1</p> <p>---</p> | 1-15 |
| A | <p>TISHLER M ET AL: "Anti- heat - shock protein antibodies in rheumatic and autoimmune diseases."</p> <p>SEMINARS IN ARTHRITIS AND RHEUMATISM, (1996 OCT) 26 (2) 558-63. REF: 25 JOURNAL CODE: UMW. ISSN: 0049-0172., XP002097730</p> <p>United States</p> <p>siehe Zusammenfassung siehe Seite 558, rechte Spalte, Zeile 3-19 siehe Seite 560, rechte Spalte, Zeile 7-22 siehe Seite 561, rechte Spalte, Zeile 39 - Seite 562, rechte Spalte, Zeile 26</p> <p>---</p> | 1-15 |
| A | <p>MACARIO A J: "Heat - shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics."</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY RESEARCH, (1995) 25 (2) 59-70. REF: 91 JOURNAL CODE: A81. ISSN: 0940-5437., XP002097732</p> <p>GERMANY: Germany, Federal Republic of</p> <p>siehe Seite 61; Tabelle 2 siehe Seite 62, rechte Spalte, Zeile 24-30 siehe Seite 68, linke Spalte, Zeile 17-39</p> <p>-----</p> | 1-15 |